

ヌクレチオドの乳中含量及びその生理効果に関する研究

著者	佐藤 則文
号	622
発行年	1999
URL	http://hdl.handle.net/10097/15938

氏 名(本籍) 佐 藤 則 文

学位の種類 博士 (農 学)

学位記番号 農 第 622 号

学位授与年月日 平成 12 年 3 月 9 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目 ヌクレオチドの乳中含量及びその生理効果に関する研究

論文審査委員	(主 査)	教 授	大久保	一 良
		教 授	村 本	光 二
		教 授	伊 藤	敏 敏

論文内容要旨

序論

健康な母親が分泌する母乳には、乳児が成長していく上で必要不可欠な栄養素が十分に含まれ、その成分・組成が生理機能や代謝機能の未熟な乳児に利用されやすいという特徴を持つ。したがって母乳は乳児にとって自然であり、理想の栄養源である。そのために乳児用調製粉乳（以下、育児用粉乳）は、成分・組成及び機能を理想とする母乳に近づけること、すなわち母乳近似化を目標に改良が行われている。

母乳の成分を科学的に分析し、その含量や特徴を把握していくことは、乳児に対する栄養生理学的な意義、役割を解明し、育児用粉乳を母乳に近づけていく上でも必須となる。これまでも育児用粉乳は、このような母乳研究を基盤に様々な成分の改良が行われてきた。しかし未だに、母乳と育児用粉乳には成分的な差があることも知られている。その一つに核酸成分、ヌクレオチドがあげられる。

ヌクレオチドは遺伝情報をつかさどる核酸（DNA、RNA）の構成成分で、エネルギー供与体としてエネルギー代謝に、あるいはタンパク質や糖質、リン脂質合成の代謝中間体として多くの生化学プロセスに関わる重要な成分である。しかしながら、栄養学的にはヌクレオチドが *de novo* 合成によって生体内で作られること、食事から摂取しても尿素として排泄されることから注目を浴びることはなかった。ところが近年になってヌクレオチドの摂取が、低栄養状態のラットの発育を促進する、ビフィズス菌の増殖を促進する、マクロファージやナチュラルキラー細胞を活性化することが相次いで報告されるようになり、栄養学的役割が見直され始めた。

ヌクレオチドは生体内で定常的に生成、分解されている。リンパ球などの免疫細胞は世代交代が早く、DNA や RNA の生成、分解も速いことから、エネルギー的に有利な salvage 合成に依存する割合が高い。同様に腸管上皮細胞や脳細胞も *de novo* 合成が制限されており、salvage 合成に依存する割合が高いことが知られている。一方、新生児期は成長も早く、DNA、RNA の合成や生体機能の維持のために十分量の基質が必要と考えられている。その基質として食事、すなわち母乳由来のヌクレオチドの重要性が認識され始めている。

そこで本研究では、ヌクレオチドが母乳に含まれる意義、生理的役割を明らかにし、最終的に育児用粉乳にヌクレオチドを強化することを目的として、母乳及び育児用粉乳中のヌクレオチド含量の分析を行い、次にヌクレオチドの生理機能として

腸管上皮細胞の増殖、分化に及ぼす効果、さらには脂質代謝、記憶学習能に及ぼす効果について検討を行った。

第1章 母乳中のヌクレオチド、ヌクレオシド含量とその泌乳期、 季節変化及び牛乳、育児用粉乳中の含量について

母乳にヌクレオチドが含まれることは古くから知られていた。しかし、母乳の採取条件や分析方法が不十分であるため、育児用粉乳の開発、改良のための基礎値・基準値として利用することは難しかった。また、日本人母乳を対象とした分析は1960年代に実施されたのみで、その後30年以上にわたって行われていなかった。そこで、育児用粉乳にヌクレオチドを強化するための指標を得るために、日本各地から収集した2,279検体の母乳を対象にヌクレオチド含量と、これまで分析報告の少なかったヌクレオシド含量をHPLCで分析した。同時に、牛乳や育児用粉乳の分析も行い、母乳と比較した。

母乳中に検出できた9種類のヌクレオチド、ヌクレオシドを分析した(Table 1)。個々のヌクレオチドやヌクレオシドは特徴的な泌乳期変化を示さなかった。また、塩基の種類別(Fig.1)あるいはヌクレオチドーリン酸(Fig.2)の比較も行ったが、同様に特徴的な変化は見られなかった。ほとんど全てのサンプルで共通した特徴は、母乳にはピリミジンヌクレオチド、ヌクレオシド（特にシチジン、CMP、CDP）が多く含まれ、生体内で主要なプリンヌクレオチドは少ないことであった。また、冬季乳にヌクレオチドやヌクレオシドが多く、夏季乳に少ない点も共通した特徴であった。

一方、牛乳や育児用粉乳中のヌクレオチド含量の分析から、含量や種類は母乳に比べて少ないことが明らかになった(Table 2)。

このように母乳中に見られた特徴、すなわち母乳にはピリミジンヌクレオチド、ヌクレオシドが多いこと、冬季乳にヌクレオチド、ヌクレオシドが多いことは、母体側のホルモンや食事による影響と考えることもできる。しかし、母乳成分は乳児にとって合目的であることから、乳児に対して栄養学的な意義を持つためとも考えられる。特にシチジンヌクレオチドが多いことが、乳児の栄養生理とどの様に関わり合っているか、また育児用粉乳にヌクレオチドが少ないことが、乳児にどのような影響を及ぼすかに興味を持たれる。そこで、現在食品添加物と認められ、育児用

粉乳に強化することの可能な5種のヌクレオチドーリン酸 (CMP、UMP、AMP、IMP、GMP) を用いて、その生理効果について検討した。

第2章 腸管上皮細胞の増殖、分化に及ぼすヌクレオチドの効果

腸管上皮細胞は短期間のうちに増殖・分化し、絨毛の先端から脱落していく。ヒトではこのサイクルが3～5日と言われるほど腸管上皮細胞の turnover は早い。このように世代交代の早い細胞では、核酸 (DNA や RNA) 合成も盛んで、ヌクレオチドの必要量も多い。また腸管上皮細胞ではヌクレオチドの *de novo* 合成に関与する酵素活性が低いために、食餌として外部からヌクレオチドを供給する必要がある。しかし、第1章で明らかにした母乳ヌクレオチドの特徴が、腸管の発達にどの様に影響するかは明らかにされていない。そこで母乳中の存在比と同じ組成比のヌクレオチド混合物を用いて、ヒト結腸腺癌細胞株 Caco-2 及びラット小腸上皮細胞株 IEC-6 の増殖、分化促進に及ぼす効果、タイトジャンクション(TJ)形成と微絨毛の発現に及ぼす効果について細胞レベルで検討した。次いで、哺乳期や離乳期ラットを用いた動物レベルでの腸管成熟に及ぼす効果についても検討した。

1) Caco-2 及び IEC-6 の細胞増殖、分化促進効果

Caco-2 及び IEC-6 の細胞増殖、分化に及ぼすヌクレオチドの効果について検討した。培地にヌクレオチドを添加して10日間培養した後、Caco-2 及び IEC-6 の細胞数を測定したところ、ヌクレオチドは Caco-2 の細胞増殖に影響しなかったが、IEC-6 の細胞増殖を促進した(Fig.3)。次に、細胞膜のマルターゼ、スクラーゼ活性を測定した結果、マルターゼおよび/またはスクラーゼ活性はヌクレオチド添加で有意に上昇した(Table 3)。したがって、ヌクレオチドは Caco-2 の細胞分化及び IEC-6 の細胞増殖、分化を促進することが明らかとなった。

また5種のヌクレオチドのどの成分が細胞増殖、分化に影響するかを検討した結果、CMP が細胞増殖を促進し(Fig4)、マルターゼ活性を上昇させた(Fig.5)。この結果から、細胞の増殖、分化を促進する成分は母乳に多く含まれる CMP であった。

2) 腸管上皮細胞の形態変化に及ぼす効果

Caco-2 を用いて、タイトジャンクション (TJ) 形成に及ぼすヌクレオチドの効果を経上皮電気抵抗値 (transepithelial electric resistance ; TEER) を指標に調べた。その結果、ヌクレオシド添加は TEER を上昇させたが、ヌクレオチド添加は TEER にほとんど影響しなかった(Fig.6)。ヌクレオチドは細胞膜のアルカリホスファターゼによってリン酸基を遊離してヌクレオシドになることから、アルカリホスファターゼがヌクレオチドの利用を制限していると考えた。そこで本酵素を誘導するトリヨードチロニン(TIT)を添加して Caco-2 を培養したところ、ヌクレオチド添加時の TEER はヌクレオシドと同程度まで上昇した(Fig.7)。また TEER の上昇はヌクレオチドの濃度に依存し、その効果は細胞増殖や分化促進効果と同様に CMP (及びシチジン) に認められた(Fig.8)。さらに細胞表面を電子顕微鏡で観察したところ、ヌクレオシド添加によって細胞表面には無数の微絨毛が形成された(Fig.9)。したがって、ヌクレオチドは TJ や微絨毛の形成を促進し、その効果の発現には、CMP (及びシチジン) が重要であった。

3) 哺乳期及び離乳期ラットの腸管成熟化に及ぼす効果

哺乳期及び離乳期ラットの腸管成熟に及ぼすヌクレオチドの効果を腸管粘膜の酵素活性を指標に調べた。哺乳期ラットにヌクレオチドを 8 日間経口投与したところ、腸管粘膜のマルターゼ/ラクターゼ比が有意に上昇した(Fig.10)。早期離乳ラットにヌクレオチド添加食を与えた場合にもラクターゼ活性、マルターゼ/ラクターゼ比に有意な変化が観察された(Fig.11)。また早期離乳ラットにヌクレオチド与えてから 3 日目にスクラーゼ活性やマルターゼ/ラクターゼ比が有意に上昇したことから、ヌクレオチドは短期間で腸管成熟を促進することが明らかになった (Fig.12)。

以上の結果から、ヌクレオチドは腸管上皮細胞の増殖や分化を促進し、その効果は TJ や微絨毛の形成といった形態的な変化にまで及ぶことを明らかにした。また、ヌクレオチドは哺乳期や離乳期ラットの腸管成熟を促進し、その効果はヌクレオチドを摂取してから短期間のうちに現れることも明らかにした。哺乳期や離乳期の腸管は未熟な状態にあり、また大きな変化をとげる時期でもある。このような時期に母乳に含まれるヌクレオチドを摂取することは、腸管の発達や機能の調節に役立ち、

さらに消化吸収能の向上やアレルギー予防効果なども期待できると考えられた。

第3章 脂質代謝、記憶学習能に及ぼすヌクレオチドの効果

脂質代謝に及ぼすヌクレオチドの効果は、血中脂肪酸の不飽和化を促進すること、リン脂質合成の代謝中間体を形成してリン脂質合成を高めることの2つの効果が知られている。前者については、新生児や未熟児をヌクレオチド強化乳で哺育すると、血中のドコサヘキサエン酸（DHA）やアラキドン酸が増加し、母乳栄養児の血中脂肪酸組成に近づくことが報告されている。この理由としては、脂肪酸の不飽和化酵素の活性発現にヌクレオチドが必要なためと考えられている。一方、後者についてはシチジンの投与が脳内のホスファチジルコリン(PC)合成を促進することが報告されている。しかし、経口摂取したヌクレオチドの脳内多価不飽和脂肪酸（PUFA）やリン脂質に及ぼす影響や、さらには脳機能の維持、改善への影響については明らかにされていない。そこで母乳中の存在比に合わせて調製したヌクレオチドの摂取が、脂質代謝や記憶学習能に及ぼす影響、さらにはヌクレオチド摂取量がこれら効果の発現に及ぼす影響を検討した。

1) 脂肪酸及びリン脂質代謝に及ぼす効果

ヌクレオチド添加食または無添加食をラットに4週間摂取させた後、大脳皮質などの脂肪酸組成、リン脂質含量（PC、PE）を分析した。まず、血清及び大脳皮質PC、PEの脂肪酸組成を分析した結果、血清脂肪酸組成に変化は見られなかったが(Table 4)、大脳皮質PCのDHA、アラキドン酸がヌクレオチド摂取で有意に増加した(Table 5)。次に、肝臓及び大脳皮質のリン脂質含量を分析した結果、肝臓中のPC、PE含量には有意な変化が見られなかったが、大脳皮質PC及びPC/PE比はヌクレオチド摂取で有意に増加した(Fig.13)。したがって、ヌクレオチドを摂取することで、脳内のPC含量やリン脂質PCのPUFAが増加することが明らかとなった。しかし大脳皮質PEの脂肪酸組成及び血清脂肪酸組成に変化が見られなかったため、従来考えられていたような不飽和化酵素を活性化する働きはないと考察した。大脳皮質PC/PE比が有意に増加することから考えて、ヌクレオチドがPC合成を促進した結果、PCの脂肪酸組成も変化したと考えられた。また、肝臓リン脂質含量に変化は見られなかった

が、肝臓ではヌクレオチドが *de novo* 合成によって盛んに作られているために食餌から摂取したヌクレオチドが影響しなかったと考えられた。

2) 記憶学習能に及ぼす効果

ヌクレオチド添加食または無添加食をラットに 4 週間摂取させた後、多重 T 型水迷路を用いて記憶学習試験を行った。その結果、ヌクレオチド摂取によって迷路を間違える回数（エラー数）が少なくなった(Fig.14)。ヌクレオチドの摂取が脳リン脂質代謝に影響し、その結果、記憶学習能が向上したと考えられた。

3) 記憶学習能、リン脂質代謝に及ぼすヌクレオチド添加量の影響

食餌中のヌクレオチド添加量を無添加、0.25%、0.5%、1.0%及び 5.0%に調整してラットに 4 週間摂取させた後、大脳皮質リン脂質含量と記憶学習との関係について検討した。ヌクレオチドを 0.5%、1.0%添加した群では、迷路を間違える回数（エラー数）が少なく(Fig.15)、記憶学習能の向上効果が認められた。また大脳皮質リン脂質分析から、0.5%、1.0%添加群で PC 含量が有意に増加した (Fig.16)。他のリン脂質も分析したところ、PI 含量も増加することが明らかになった(Fig.16)。したがって、脳内 PC、PI 含量の増加が学習の獲得に影響を及ぼしたと考えられた。しかし、ヌクレオチドを 5.0%に増やしても優れた効果は得られないことから、ヌクレオチドの摂取には至適レベルがあると考えられた。

以上、食餌から摂取したヌクレオチドが脳内のリン脂質代謝に影響した。リン脂質合成にはシチジンヌクレオチドが関与することから、母乳中に多いシチジン、CMP、CDP が重要である。特に、脳内の CTP レベルは低値で、*de novo* 合成も限られていることから、シチジンヌクレオチドを摂取する必要性は高いと考えられる。また、脳内で生じたリン脂質の変化が、記憶学習の獲得に重要な役割を持つと考えられる。ラットではヌクレオチドを摂取する際に至適レベルがあることが明らかになった。したがって、ヒト乳児でも至適レベルが存在する可能性があり、育児用粉乳にヌクレオチドを強化するに際しては母乳と同程度に設定することが望ましいと考えられた。

結論

本研究では、母乳及び育児用粉乳とその原料である牛乳中のヌクレオチド、ヌクレオシド含量やその特徴を明らかにし、さらには腸管上皮細胞の増殖、分化及び脂質代謝、記憶学習能に及ぼすヌクレオチドの効果を明らかにすることを目的とした。

母乳中には3種のヌクレオシド、5種のヌクレオチドーリン酸、1種のヌクレオチドニリン酸が存在し、特にピリミジンヌクレオチド（シチジン、CMP、CDP）が多く含まれていた。一方、育児用粉乳やその原料である牛乳中の含量は母乳に比べて少ないことが明らかになった。そこで母乳に多く、育児用粉乳に少ないヌクレオチドがどのような役割を持つかについて腸管及び脳を対象に検討した。

まず、腸管上皮細胞の増殖、分化に及ぼす効果を調べたところ、ヌクレオチドは細胞増殖、分化を促進すること、さらに TJ や微絨毛の形成にも影響することを明らかにした。またラットを用いた検討から、ヌクレオチドは哺乳期及び離乳期ラットの腸管の成熟化に影響することを明らかにした。

一方、ヌクレオチドの摂取は脳皮質 PC、PI 含量や PUFA を増加させた。この変化は肝臓や血清に見られなかったことから、脳特異的であると考えた。また、脳リン脂質の増加が、記憶学習の獲得に重要であると考察した。

以上の結果を踏まえて、母乳に含まれるヌクレオチド（特に CMP）が乳児の腸管や脂質代謝、脳機能の発達に重要な役割を持つと考えた。したがって、育児用粉乳にヌクレオチドを強化することは、乳児の正常な機能発達を促す上でも必要であり、ヌクレオチドは乳幼児にとって準必須栄養素(semiessential nutrient)として、乳児の健やかな発育に大きく寄与すると考えられた。

Table 1. Contents of nucleotides and nucleosides in human milk during lactation.

<i>Winter milk</i> (μ mol/100ml)								
Components	Lactation(Postpartum days)							
	3-5	6-10	11-15	16-30	31-60	61-120	121-240	241-482
Nucleotides								
Monophosphate								
CMP	4.06	3.26	1.65	2.38	3.87	4.29	3.87	2.63
UMP	0.11	0.27	n.d.	0.27	0.30	0.23	0.19	0.07
AMP	0.35	0.36	0.28	0.35	0.26	0.23	0.21	0.20
GMP	n.d.*	0.09	0.09	0.08	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IMP	n.d.	n.d.	0.10	0.12	0.14	n.d.	n.d.	n.d.
Total amount	4.52	3.98	2.12	3.20	4.57	4.75	4.27	2.90
Diphosphate								
CDP	6.98	6.00	0.50	0.63	0.52	0.43	0.53	0.60
Nucleosides								
Cytidine	3.43	2.16	1.37	2.46	2.02	1.81	1.42	1.39
Uridine	1.84	0.90	2.75	3.12	3.26	2.39	1.87	1.83
Adenosine	n.d.	n.d.	1.19	1.02	1.11	1.22	1.14	0.67
Total amount	5.27	3.06	5.31	6.60	6.39	5.42	4.43	3.89
<i>Summer milk</i> (μ mol/100ml)								
Components	Lactation(Postpartum days)							
	3-5	6-10	11-15	16-30	31-60	61-120	121-240	241-482
Nucleotides								
Monophosphate								
CMP	2.20	0.65	0.93	0.94	1.26	0.38	0.25	0.25
UMP	0.06	n.d.	0.05	0.08	0.05	n.d.	n.d.	n.d.
AMP	0.22	0.18	0.16	0.15	n.d.	0.16	0.25	0.21
GMP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IMP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.07	n.d.	n.d.	0.09
Total amount	2.48	0.83	1.14	1.17	1.38	0.54	0.50	0.55
Diphosphate								
CDP	0.58	0.83	0.51	0.49	0.74	0.52	0.34	0.59
Nucleosides								
Cytidine	n.d.	1.43	1.26	1.56	1.32	1.50	1.24	1.18
Uridine	3.33	1.56	1.75	1.24	1.62	1.26	0.37	1.39
Adenosine	0.67	0.71	0.46	0.32	1.62	0.65	0.49	0.78
Total amount	4.00	3.70	3.47	3.12	4.56	3.41	2.10	3.35

*n.d.=not detected

Table 2. Contents of nucleotides in bovine milk and infant formula.

(μ mol/100ml)

(g/100g milk)				
Nucleotides	Bovine milk		Infant formula	Human milk**
	Colostrum	Matured milk		
Monophosphate				
CMP	0.19	0.99	0.70	2.05
UMP	0.15	0.06	0.08	0.11
AMP	n.d.*	0.14	n.d.	0.22
GMP	n.d.	n.d.	0.08	0.02
IMP	0.01	0.01	0.04	0.03
Total amount	0.35	1.20	0.90	2.43

*n.d.=not detected

**Average of nucleotides in all lactation.

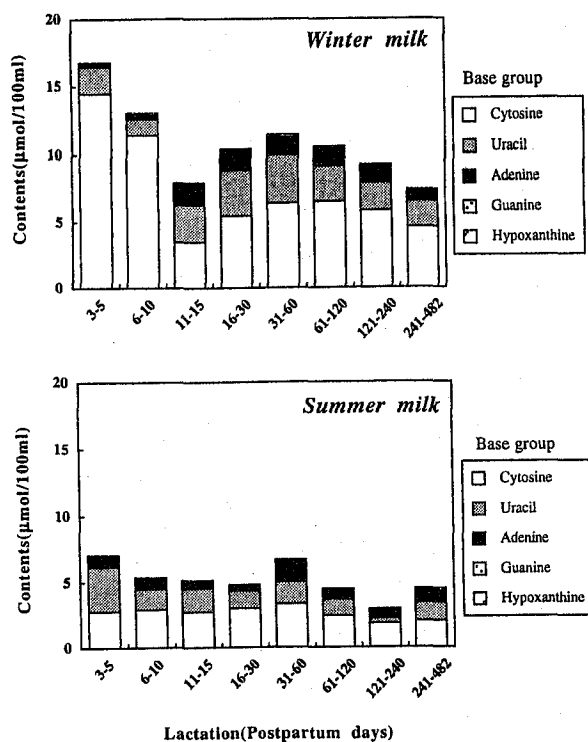


Fig.1. Lactational changes of nucleotides and nucleosides classified by base group in human milk .

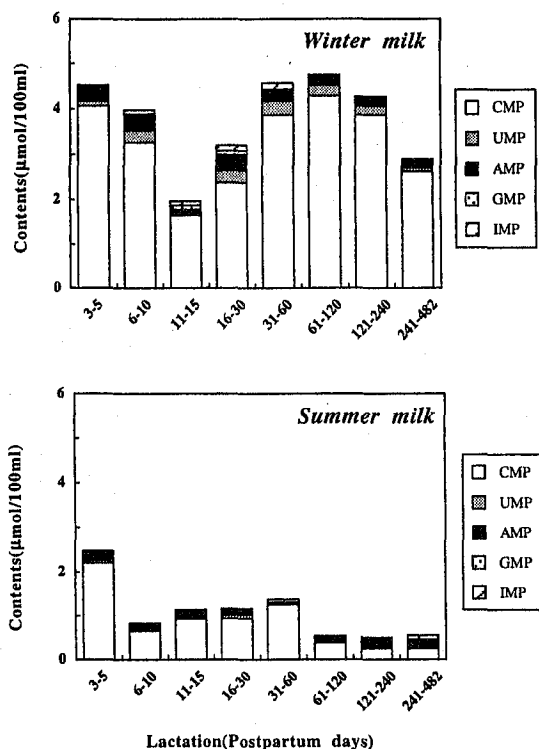


Fig.2. Lactational changes of nucleotide monophosphate in human milk.

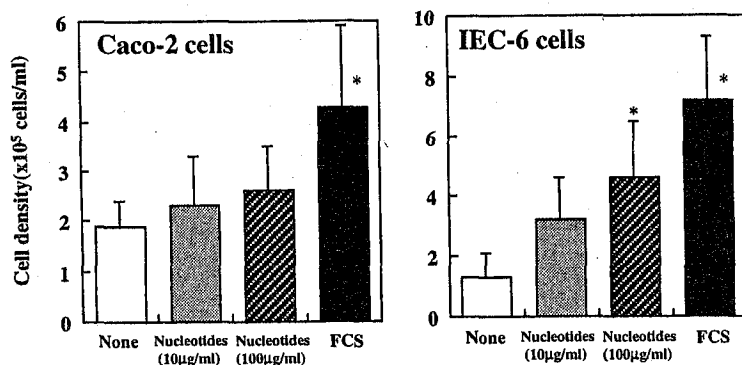


Fig.3. Effects of exogenous nucleotides on the proliferation of Caco-2 and IEC-6 cells.

*Significantly different from control culture medium without nucleotides , $p < 0.05$.

Table 3. Effects of exogenous nucleotides on enzyme activity of Caco-2 and IEC-6 cells.

Supplement	Caco-2 cells		IEC-6 cells	
	Maltase (nmol/min/mg protein)	Sucrase (nmol/min/mg protein)	Maltase (nmol/min/mg protein)	Sucrase (nmol/min/mg protein)
None	48.8 ± 10.1	1.6 ± 1.4	0.3 ± 0.1	<0.1
Nucleotides(10 μg/ml)	61.7 ± 8.7*	6.4 ± 1.3*	2.3 ± 0.9*	<0.1
Nucleotides(100 μg/ml)	81.9 ± 14.9*	9.8 ± 1.8*	1.9 ± 0.5*	<0.1
7%FCS	112.1 ± 15.9*	18.5 ± 4.7*	5.4 ± 2.2*	1.8 ± 0.4

Values are means ± SD of three determination.

*Significantly different from the control culture medium without nucleotides, $p < 0.05$.

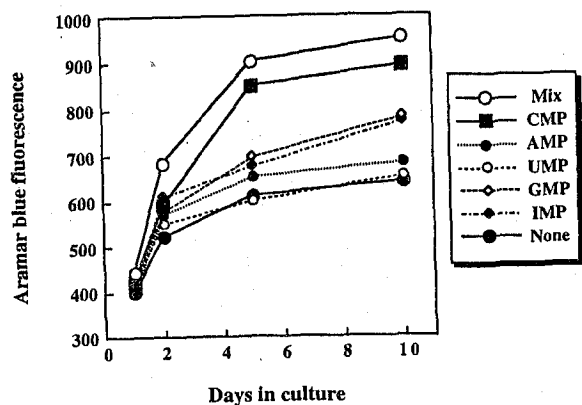


Fig.4. Effect of individual nucleotides on the proliferation of IEC-6 cells.

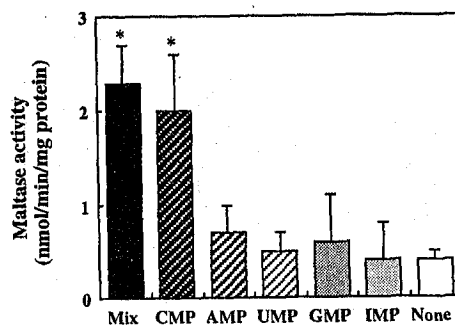


Fig.5. Effect of individual nucleotides on maltase activity of IEC-6 cells.

*Significantly different from control culture medium without nucleotides, $p < 0.05$.

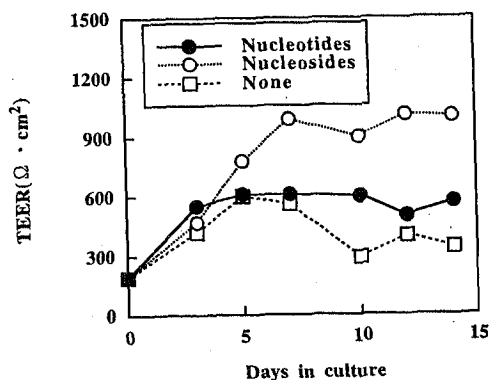


Fig.6. Effect of nucleotides and nucleosides on the TEER of Caco-2 cell monolayer.

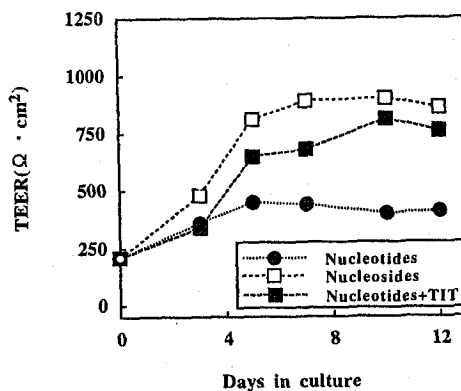


Fig.7. Effect of nucleotides and TIT on the TEER of Caco-2 cell monolayer.

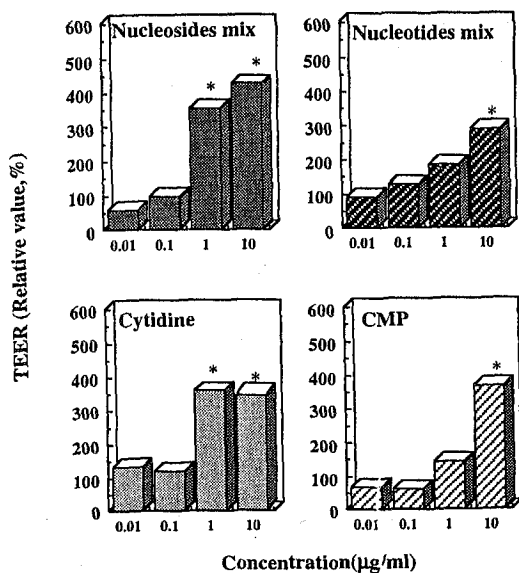


Fig.8. Effect of nucleotides or nucleosides concentrations on the changes in TEER of Caco-2 cell monolayer.

*Significantly different from control culture medium without nucleotides or nucleosides, $p < 0.05$.

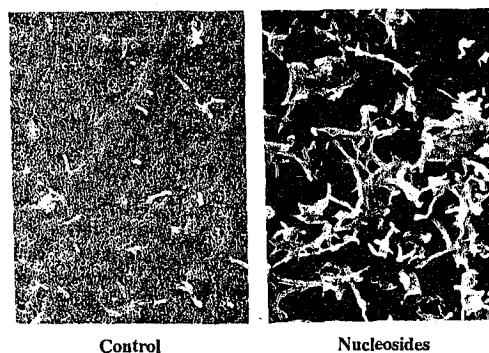


Fig.9. Scanning electron micrograph of a Caco-2 cell monolayer cultured in medium containing nucleosides.

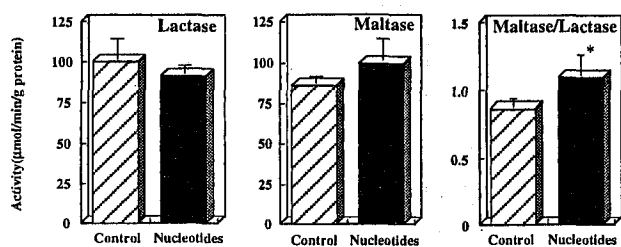


Fig.10. Effects of nucleotides on lactase and maltase activity, and maltase/lactase ratio of intestinal mucosa in suckling rats.

*Significantly different from control, $p < 0.05$.

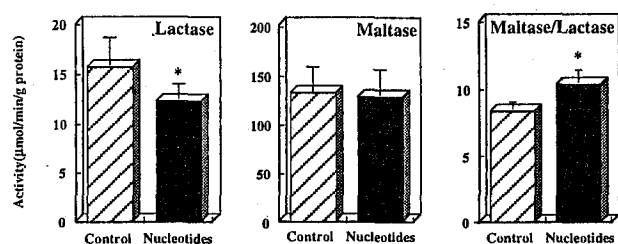


Fig.11. Effects of nucleotides on lactase and maltase activity, and maltase/lactase ratio of intestinal mucosa in early weaned rats.

*Significantly different from control, $p < 0.05$.

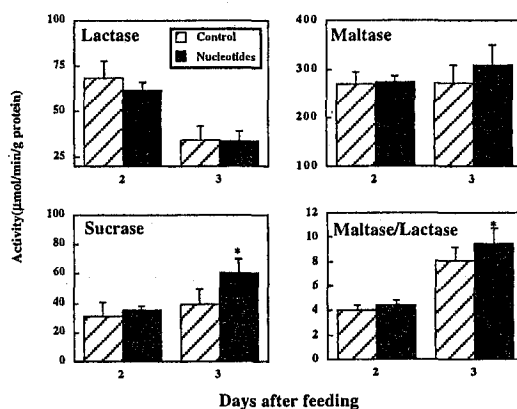


Fig.12. Effects of dietary nucleotides on the maturation of intestine in early weaned rats.

*Significantly different from control, $p < 0.05$.

Table 4. Fatty acid composition of PC and PE in serum of rats fed nucleotide supplemented diet.

Fatty acids	PC		PE	
	Control	Nucleotides	Control	Nucleotides
C16:0	22.17 ± 2.17	22.32 ± 1.97	4.88 ± 2.07	5.36 ± 1.18
C18:0	21.93 ± 1.30	21.97 ± 1.19	9.77 ± 1.32	8.54 ± 1.29
C18:1(n-9)	3.00 ± 0.47	2.88 ± 0.26	2.99 ± 1.13	2.74 ± 1.28
C18:2(n-6)	14.35 ± 2.07	14.51 ± 1.50	2.47 ± 0.99	2.34 ± 0.79
C20:4(n-6)	22.16 ± 2.16	22.07 ± 2.58	8.05 ± 3.62	6.74 ± 3.73
C22:4(n-6)	-	-	-	-
C22:5(n-3)	0.82 ± 0.31	0.87 ± 0.18	0.98 ± 0.48	0.84 ± 0.43
C22:6(n-3)	6.71 ± 1.01	6.71 ± 0.97	2.38 ± 1.20	2.16 ± 1.40
Total n-6	37.53 ± 1.89	37.57 ± 2.59	13.91 ± 4.77	12.36 ± 5.13
Total n-3	7.63 ± 0.99	7.68 ± 1.06	3.41 ± 1.61	3.02 ± 1.85
n-6/n-3	4.97 ± 0.47	4.99 ± 0.84	4.46 ± 1.00	4.55 ± 0.93

Values are means ± SD.

Table 5. Fatty acid composition of PC and PE in cerebral cortex of rats fed nucleotide supplemented diet.

Fatty acids	PC		PE	
	Control	Nucleotides	Control	Nucleotides
C16:0	46.03 ± 1.71	43.96 ± 1.71	4.85 ± 0.51	5.28 ± 1.10
C18:0	12.87 ± 0.95	13.42 ± 1.18	15.57 ± 0.89	15.64 ± 0.82
C18:1(n-9)	20.18 ± 1.11	20.18 ± 1.26	9.95 ± 0.53	9.73 ± 0.04
C18:2(n-6)	1.03 ± 0.18	1.17 ± 0.49	0.60 ± 0.16	0.65 ± 0.18
C20:4(n-6)	4.29 ± 0.40	5.27 ± 0.54 *	10.90 ± 0.72	10.84 ± 0.05
C22:4(n-6)	0.51 ± 0.10	0.65 ± 0.10	4.25 ± 0.36	4.27 ± 0.23
C22:5(n-3)	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.02 *	0.21 ± 0.03	0.21 ± 0.02
C22:6(n-3)	2.10 ± 0.30	2.90 ± 0.33 *	15.90 ± 0.95	16.36 ± 1.91
Total n-6	6.17 ± 0.37	7.47 ± 0.97 *	16.29 ± 0.95	16.35 ± 0.64
Total n-3	2.17 ± 0.30	2.96 ± 0.34 *	16.12 ± 0.96	16.59 ± 1.19
n-6/n-3	2.89 ± 0.28	2.52 ± 0.17 *	1.01 ± 0.04	0.99 ± 0.03

Values are means ± SD. *Significantly different from control, $p < 0.05$.

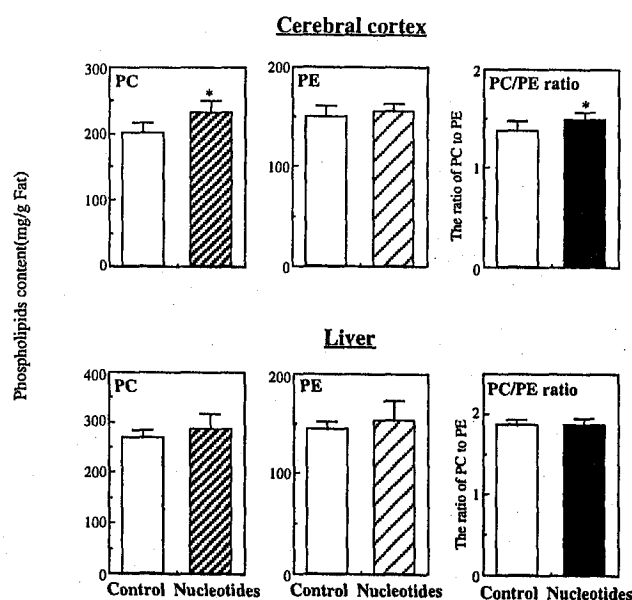


Fig.13. Phospholipid contents and PC/PE ratio in the cerebral cortex and liver.

*Significantly different from control, $p < 0.05$.

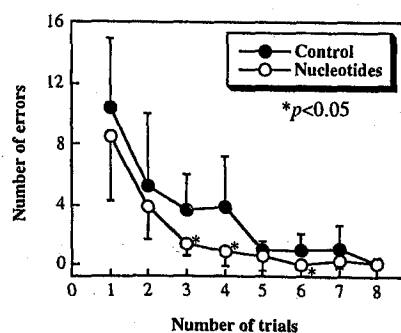


Fig.14. The number of errors made by rats fed nucleotide supplemented diet in the T-maze.

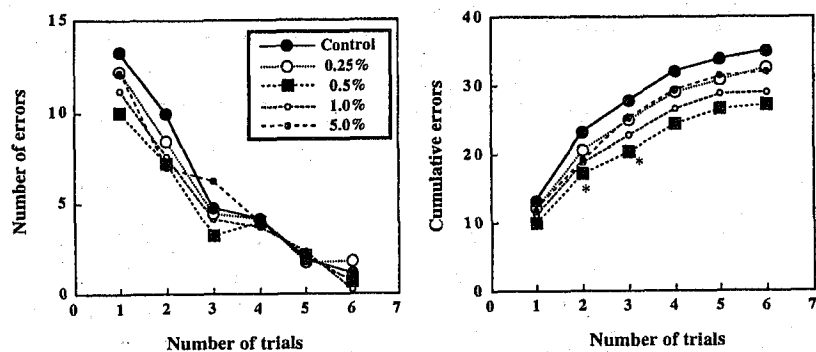


Fig.15. Effect of nucleotide level in the diet on the number of errors and cumulative errors made by rats in the T-maze.

*Significantly different from control, $p < 0.05$.

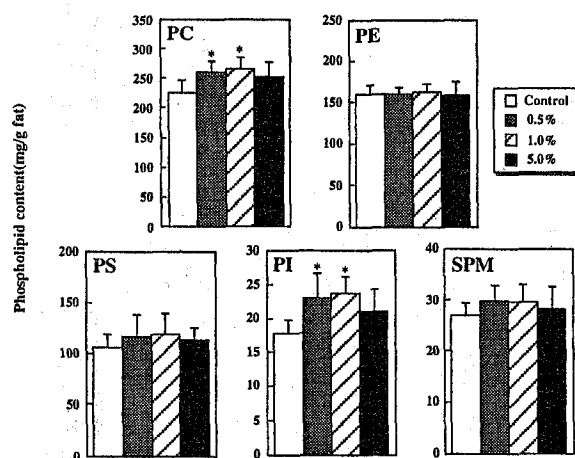


Fig.16. Phospholipid contents in cerebral cortex of rats fed nucleotide supplemented diet

*Significantly different from control, $p < 0.05$.

論文審査結果要旨

健康な母乳が分泌する母乳には、乳児が成長していく上で必要不可欠な栄養素が十分にふくまれ、乳児にとって理想的栄養源である。しかし母乳と育児用粉乳には成分的な差のあることが知られ、その一つに核酸成分、ヌクレオチドがあげられる。そこで本研究では、ヌクレオチドが母乳に含まれる意義、生理的役割を明らかにし、最終的に育児用粉乳にヌクレオチドを強化することを目的として、母乳および育児用粉乳のヌクレオチド含量の分析を行い、次にヌクレオチドの生理機能として腸管上皮細胞の増殖、分化に及ぼす効果、さらには脂質代謝、記憶学習能に及ぼす効果について検討を行った。第Ⅰ章では母乳中のヌクレオチド、ヌクレオシド含量と泌乳期、季節変化および牛乳、育児用粉乳中の含量について検討した。その結果、ピリミジンヌクレオチド、ヌクレオシド(特にシチジン、**CMP**、**CDP**)が多く含まれ、生体内での主要なプリンヌクレオチドは少ないことがわかった。一方、牛乳や育児用粉乳のヌクレオチド含量と種類は母乳に比べて少ないことが明らかとなった。第Ⅱ章では、腸管上皮細胞の増殖、分化に及ぼす効果について検討した。その結果、ヌクレオチドはヒト結腸腺癌細胞Coca-2の細胞分化およびラット小腸上皮細胞株IEC-6の細胞増殖と分化を促進することが明らかとなった。その成分は母乳に多く含まれる**CMP**であることを明らかにした。さらにヌクレオチドはタイトジャンクションや微絨毛の形成を促進し、その発現には**CMP**が重要であった。さらに腸管成熟も促進した。第Ⅲ章では、脂質代謝、記憶学習能に及ぼすヌクレオチドの効果について検討した。その結果、ヌクレオチドは脳皮質のリン脂質(**PC**,**PI**)含量を有意に増加させ、特に脳内多価不飽和脂肪酸(**PUFA**)の増加を明らかにすることができた。この変化は肝臓や血清に見られなかったことから、脳特異的とであると考えられた。また学習記憶試験の結果、エラー数が少なくなり、ヌクレオチドの摂取が脳リン脂質代謝に影響し、その結果、記憶学習能が向上したものと考えられた。以上の結果を踏まえて、母乳に含まれるヌクレオチド(特に**CMP**)が乳児の腸管や脂質代謝、脳機能の発達に重要な役割を演じていると結論される。従って、育児用粉乳にヌクレオチドを強化することは、乳児の正常な機能発達を促す上でも必要であり、準必須栄養素と考えられる。

以上の結果は、育児用粉乳の強化の必要性を明らかにしたもので、実用性の高い研究成果であり、実用面でも評価されていることから、博士(農学)の学位を授与するに値すると判定した。